

# エプスタイン・バーウイルス(EBV)を用いた形質 転換法により樹立された, 抗体遺伝子再構成のない ヒト細胞株

著者	大津 正之
号	906
発行年	1984
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/25368">http://hdl.handle.net/10097/25368</a>



# 論文内容要旨

## 目 的

B細胞は分化に伴い抗体遺伝子の構造を変える（再構成）ことが、これまでの研究で明らかにされている。しかし、その遺伝子再構成がいかなる分子機構を経て行われるかは、いまだに不明な点が多い。我々の樹立した細胞株 FLEB 14 は、胎生 16 週のヒト胎児肝に由来し、Epstein - Barr virus (EBV) でトランスフォームした細胞であり、B細胞の性状を有しながら抗体産生がなかった。EBV の標的細胞はヒトないし一部の霊長類の B細胞とされ、また、EBV でトランスフォームした細胞は一般的に抗体産生を伴う。従って、この FLEB 14 は、B細胞系において特異な位置を占めると考えられた。本研究では、抗体遺伝子再構成の機構解明を目的とし、この細胞において抗体遺伝子がいかなる構成をなしているかを検討した。

## 方 法

細胞より抽出した高分子 DNA を、適当な制限酵素で完全消化後、アガロース・ゲル電気泳動を行い、サザン法に従ってニトロセルロース膜へ移し固定する。一方、ヒト遺伝子ライブラリーより単離したヒト免疫グロブリン遺伝子断片  $J_H \cdot C_\mu$ 、 $J_\kappa$  および  $C_\lambda$  をそれぞれ H鎖、 $\kappa$  鎖、および  $\lambda$  鎖遺伝子のプローブとした。これらをニック・トランスレーションにより  $^{32}P$  でラベルし、フィルターに固定した DNA とハイブリダイズさせることにより、免疫グロブリン遺伝子を含む断片の大きさを知りうる。対照にはヒト胎盤 DNA を用い、これらの結果を比較して、H鎖、 $\kappa$  鎖および  $\lambda$  鎖遺伝子の構造変化の有無を検討した。

## 結 果

FLEB 14 の H鎖遺伝子は、 $J_H$  および  $C_\mu$  プローブで検討すると、Hind III, EcoR I, Xba I, Kpn I および Bgl II のいずれの場合にも胎盤 DNA に一致した結果を示した。BamH I では、胚細胞型の断片の他に再構成型の断片が見出された。その制限地図から、これらの切断部位により占められ、5'側は EcoR I 部位から 3'側は Kpn I 部位にわたる約 30 kb の領域は、 $J_H$  および  $C_\mu$  遺伝子の両者を含み、かつ点突然変異的な BamH I 部位を伴う胚細胞型の構造を示すと考えられた。BamH I 処理下で  $J_\kappa$  プローブを用い  $\kappa$  鎖遺伝子を、EcoR I 処理下で  $C_\lambda$  プローブを用い  $\lambda$  鎖遺伝子を、それぞれ検討した。その結果、両者とも胚細胞型の所見を示した。以上から、この FLEB 14 は、B細胞系に位置し、かつ胚細胞型の H鎖・L鎖遺伝子構成をとる細胞株と判断された。

FLEB 14 を継代中に、この細胞とは異なる遺伝子構成を示す二つの細胞株 FLEB 14・43 および FLEB 14・45 を見出した。

細胞株 14・43 で H鎖遺伝子を検討すると、Hind III 処理下では胚細胞型の断片が、EcoR I および Kpn I 処理下では胚細胞型と再構成型からなる二本の断片が認められた。Hind III 断片は J<sub>H</sub> 遺伝子の 3' 側ごく近傍までをカバーするのに対し、EcoR I および Kpn I 断片は J<sub>H</sub> 遺伝子より下流域の C<sub>μ</sub> 遺伝子近傍ないしそれを含む領域までをカバーする。EcoR I-Hind III および Kpn I-Hind III という組み合わせの二重消化では、J<sub>H</sub> 遺伝子を含む上流域は両相同染色体とも胚細胞型を示す結果であった。従って、一方の相同染色体でのみ、J<sub>H</sub> 遺伝子の 3' 側で構造変化をおこしていると推定された。同一フィルターを J<sub>H</sub> プローブで、ついで C<sub>μ</sub> プローブで検討した結果、Kpn I および BamH I 処理下でみられた再構成を示す断片は、両プローブで異なる大きさを示した。この結果は、J<sub>H</sub>・C<sub>μ</sub> 遺伝子間の介在配列の単純な欠損では説明できず、J<sub>H</sub>・C<sub>μ</sub> 遺伝子間の距離が伸びていることを示唆した。すなわち、構造変化は、J<sub>H</sub> 遺伝子の 3' 側でみられ、抗体産生細胞でみられる変化とは異なるものと判断された。

もう一つの細胞株は、14 とともに 14・43 と異なる抗体遺伝子構成をとる FLEB 14・45 である。その DNA を EcoR I、Hind III および Kpn I で処理し、J<sub>H</sub> プローブで検討すると、いずれの場合にも胎盤 DNA とは異なる大きさの二断片を検出した。この場合、EcoR I-Hind III および Kpn I-Hind III による二重消化でも J<sub>H</sub> プローブで二本の再構成型の断片を認めた。J<sub>H</sub>・C<sub>μ</sub> 遺伝子は、この細胞では正常の連鎖状態を示した。従って、この細胞株は、両相同染色体で J<sub>H</sub> 遺伝子の 5' 側で再構成をおこしており、抗体産生細胞でみられるような遺伝子構造変化を示すと推定された。

## 考 察

FLEB 14 は、抗体非産生、かつ胚細胞型の抗体遺伝子構成を示す B 細胞系の細胞と考えられた。こうした細胞はこれまでに報告がなく、また、pre-B 細胞よりさらに未熟な細胞と考えられる。その抗体遺伝子再構成の誘導は、その分子機構解明にとり有用な系となろう。EBV がこうした未熟な B 細胞系の細胞にまでも感染しうることも重要な点であろう。FLEB 14 継代中に得られた FLEB 14・43 および FLEB 14・45 の両者は、14 とは異なる抗体遺伝子構成を示した。これらが FLEB 14 からの正常な再構成過程を示すかどうかは今後の課題であるが、14・43 はその遺伝子構成が特異であり、*c-myc* やトランスポゾンなどの関与が考えられ、興味ある問題を提起している。

## 審 査 結 果 の 要 旨

抗体産生細胞は造血幹細胞よりの分化過程で抗体遺伝子の再構成がおこることが推定されている。しかし、抗体遺伝子が再構成されていない未分化なB細胞系の細胞はこれまで得られておらず、分化過程の細胞における再構成の時期、そしてそれらの分子機構についてはまだ不明な点が多い。さらに、当研究室の片峰らはヒト胎児肝リンパ球を Epstein-Barr ウイルスでトランスフォームして樹立した多くの細胞株の中に、B細胞の性状を有しながらイムノグロブリン(Ig)産生のみられない細胞株(FLEB-14)があることを初めて見出した。

著者はこのFLEB-14細胞のIg遺伝子がどのような構成をしているのかについて詳細に解析するために研究を行った。この研究に用いた方法はいわゆる Southern ハイブリッド法であり、クローン化した $C_{\mu}$ ,  $J_H$ ,  $J_K$ ,  $C_{\lambda}$  遺伝子断片をIgのH鎖およびL鎖遺伝子のプローブとして、種々の制限酵素で消化したFLEB-14細胞のDNAについて詳細に調べた。その結果は、次の二点にまとめることができる。(1) FLEB-14細胞ではH鎖遺伝子、L鎖の $\kappa$ ,  $\lambda$  遺伝子のいずれもが胚細胞型の構造を保っており、いまだ再構成されていないこと。(2) FLEB-14細胞を継代培養中に、この細胞がH鎖遺伝子の再構成をおこすこと。そして、その再構成をおこした新しい細胞亜株はそれぞれFLEB-14・43, FLEB-14・45と名付けた。前者は $J_H$  遺伝子の3'側、後者は5'側に再構成がおこっていることを確めた。しかし、この構造変化が正常のIg遺伝子の再構成過程を再現しているのかどうかについてはまだ明らかでない。

抗体を産生せず、かつ胚細胞型のIg遺伝子構成を示すB細胞系の細胞はこれ迄に報告がなく、FLEB-14は早期分化B細胞と考えられる。またこの細胞が継代培養中に再構成型のH鎖遺伝子構造をとるようになったことを見出したことは、FLEB-14がB細胞の分化過程を追求する上で有用な系となり得ることを示唆している。

以上本研究は極めて独創的かつ重要な新知見をもたらしたものであり、学位授与に値するものと認める。